

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510039105.9

A61K 36/16 (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61K 127/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 7 月 25 日

[11] 授权公告号 CN 1327853C

[22] 申请日 2005.4.26

[21] 申请号 200510039105.9

[73] 专利权人 南京大学

地址 210093 江苏省南京市汉口路 22 号

[72] 发明人 张志炳 徐志红 李 磊 武法文
谭淑娟

[56] 参考文献

CN1233369A 2004.4.7

超滤深度提纯银杏黄酮 徐志红 肖泽仪 李
磊 张志炳, 精细化工, 第 21 卷第 2 期 2004

审查员 程心旻

[74] 专利代理机构 南京知识律师事务所

代理人 黄嘉栋

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 1 页

[54] 发明名称

亲和超滤提高银杏叶提取物中黄酮含量的方法

[57] 摘要

一种亲和超滤提高银杏叶提取物中黄酮含量的方法, 它包括下列步骤: 1. 首先将聚偏二氟乙烯超滤膜浸入含有 KOH 的 KMnO_4 水溶液, 加热 6 ~ 12min 后, 用水洗去表面残留液, 浸入酸性 NaHSO_3 溶液中漂洗, 再将膜浸入聚乙烯吡咯烷酮溶液, 然后将膜取出在真空烘箱中干燥, 干燥后浸入水中保存待用。2. 将银杏粗提液用乙醇水溶液溶解, 溶液通过 0.22 μm 的微滤膜微滤; 3. 将微滤液首先通过磺化聚醚砜超滤膜进行普通超滤; 4. 将上述微滤液通过液用碱调节 pH 值为 7.5 ~ 8.8 之后, 通过改性聚偏二氟乙烯亲和超滤膜进行亲和超滤; 5. 其截留液经过减压蒸馏, 真空干燥, 即得到黄酮含量高的银杏叶提取物。此法可将银杏叶提取物中黄酮的含量提高到 30% 或以上。

1. 一种亲和超滤提高银杏叶提取物中黄酮含量的方法，它包括下列步骤：

一、 改性聚偏氟乙烯亲和超滤膜的制备：首先将聚偏氟乙烯超滤膜浸入质量百分浓度为 0.2-5.0% 的 KMnO_4 水溶液，溶液中每升含有 0.3-5mol 的 KOH ，在 40-70℃ 温度下加热 6-12min 后膜呈棕褐色，将其取出后用大量的清水洗去表面残留反应液，浸入酸性 NaHSO_3 溶液中漂洗直到膜表面恢复成白色，再将膜浸入 1.0-3.0% 的聚乙烯吡咯烷酮溶液，在 30℃ 下浸泡 30-60min，然后将膜取出在真空烘箱中干燥 15-25min，干燥温度为 40-60℃，干燥结束后浸入水中保存待用；

二、 将银杏粗提浸膏用 50-200 倍质量的质量百分浓度为 20-50% 的乙醇水溶液溶解，溶液通过 0.22 μm 或 0.45 μm 的微滤膜微滤；

三、 将微滤液首先通过截留相对分子质量为 60000-70000 道尔顿的磺化聚醚砜超滤膜进行普通超滤，操作压力为 0.15-0.25MPa，温度为 30-45℃；

四、 将上述微滤透过液用碱调节 PH 值为 7.5-8.8 之后，通过截留相对分子质量为 3000-8000 道尔顿的改性聚偏氟乙烯亲和超滤膜进行亲和超滤，操作压力为 0.15-0.25MPa，温度为 35-45℃；

五、 其截留液经过减压蒸馏，真空干燥，即得到黄酮含量高的银杏叶提取物。

亲和超滤提高银杏叶提取物中黄酮含量的方法

一、技术领域

本发明涉及用功能性亲和超滤膜超滤银杏叶提取物以提高提取物中黄酮含量的方法。

二、背景技术

银杏叶，为银杏科银杏属植物银杏（*Ginkgo Biloba*）的叶子。银杏是我国的特产之物，是现存古代子遗植物之一。银杏叶中含有黄酮化合物（flavonoids）、萜类化合物（terpenoids）等生物活性成分。这些成分具有相当强烈的抗氧化作用，能清除生物体内过剩的自由基、防止组织体内脂质过氧化、提高人体机体的免疫力等，是首选的治疗心脑血管疾病的天然药物。近十多年来，国内外对这一资源的开发利用作了大量的研究工作。据报道，银杏叶中主要的黄酮类化合物槲皮素、山奈素和异鼠李素等对于改善心、脑血液循环，降低血清胆固醇，松弛支气管有很好的疗效。

目前，银杏叶黄酮苷生产工艺主要有溶剂萃取法、超临界萃取法和树脂吸附法。其中溶剂萃取法成本高，超临界萃取法设备投入大，目前尚未工业化。国内银杏叶提取物（GBE）的生产基本采用树脂吸附法，但是该工艺过程同样存在操作时间长，对有机溶剂消耗较多的缺点。

除了以上三种主要生产工艺，超滤膜分离技术也已用于研究银杏黄酮的纯化过程，其特点是可以有效地去除各种杂质，提高了产物的澄清度，储存稳定性好；分离过程在常温下进行，因而产物中有效成分的生物活性和理化性质稳定；生产工艺流程简单，生产周期短；在密闭空间中操作，节省了有机溶剂，未引入新的杂质。

超滤膜分离机理主要是通过分子尺寸来区分，因此当目标物质与待分离杂质分子量差异不大时，超滤膜的分离选择性显得不理想。由于银杏黄酮提取液略带酸性，本发明使用化学稳定性能较好的聚偏氟乙烯（PVDF）超滤膜，通过在膜表面植入功能性基团，对银杏黄酮进行选择分离，这样除了可以对分子量差异较大的物质进行有效的分离外，还可以对分子量相近的物质进行特异性的区分，从而达到进一步富集黄酮的目的。

三、发明内容：

本发明的目的在于提供一种利用改性亲和超滤膜精制银杏黄酮的方法。

一种亲和超滤提高银杏叶提取物中黄酮含量的方法，它包括下列步骤：

1. 改性聚偏氟乙烯 (PVDF) 亲和超滤膜的制备: 首先将 PVDF 超滤膜浸入浓度为 0.2-5.0% (质量百分数) 的 KMnO_4 水溶液, 溶液中每升含有 0.3-5mol 的 KOH, 在 40-70℃ 温度下加热 6-12min 后膜呈棕褐色, 将其取出后用大量的清水洗去表面残留反应液, 浸入酸性 NaHSO_3 溶液中漂洗直到膜表面恢复成白色, 再将膜浸入 1.0-3.0% 的聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 溶液, 在 30℃ 下浸泡 30-60min, 然后将膜取出在真空烘箱中干燥 15-25min, 干燥温度为 40-60℃, 干燥结束后浸入水中保存待用 (参见: 吕晓龙, 赵卫光, 胡成松, 胡新萍等, 聚偏氟乙烯中空纤维表面化学改性, 天津纺织工学院学报, 18 (4), 1999)。

2. 将银杏粗提浸膏用 50-200 倍质量的 20-50% (质量百分数, 下同) 乙醇水溶液溶解, 溶液通过 0.22 μm 的微滤膜微滤;

3. 将微滤液首先通过截留相对分子质量为 60000-70000 道尔顿的磺化聚醚砜 (SPES) 超滤膜进行普通超滤, 操作压力为 0.15-0.25MPa, 温度为 30-45℃, 将银杏叶提取物 (GBE) 微滤液中含有的大分子杂质如淀粉、糖类、蛋白质等截留在 SPES 超滤膜的上游侧;

4. 将上述超滤透过液用碱调节 PH 值为 7.5-8.8 之后, 通过截留相对分子质量为 3000-8000 道尔顿的改性聚偏二氟乙烯亲和超滤膜进行亲和超滤, 操作压力为 0.15-0.25MPa, 温度为 35-45℃;

5. 其截留液经过减压蒸馏, 真空干燥, 即得到黄酮含量高的银杏叶提取物。

采用本发明的亲和超滤提高银杏叶提取物中黄酮含量的方法, 可以将银杏叶提取物中黄酮的质量分数提高到 30%。

四、附图说明

图 1 为 PVDF 膜改性前的 FTIR 图;

图 2 为接枝 PVP 后的 PVDF 膜的 FTIR 图。

由以上红外谱图可以看出, 波长在 3500 cm^{-1} 处出现明显的强峰, 这是一 OH 的强吸收峰, 同时在 2890 cm^{-1} 出现的中强峰是 $-\text{CH}_2$ 的特征吸收峰, 1633 cm^{-1} 出现的是一 C=O 的特征吸收峰。综合以上吸收峰的变化, 我们可以很明显的看出来, 膜改性之后, PVP 已经结合到原来的 PVDF 超滤膜上。

五、具体实施方式

实施例 1

将直径为 20cm 的 PVDF 平板膜一张, 浸入浓度为 1% 的 KMnO_4 和 1.0 mol/L 的 KOH 的混合溶液 500mL, 在 60℃ 温度下反应 12min, 取出膜用蒸馏水漂洗, 洗去表面残留反应液, 浸入 1.0% 浓度的酸性 NaHSO_3 溶液中漂洗直到膜表面恢复成白色, 再将膜浸入 3.0% 的聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 溶液, 在 30℃ 下浸泡 30 min, 然后将膜取出在真空烘箱中干燥 15min, 干燥温度为 40℃, 干燥结束后取样进行分析, 主要通过 FTIR (红外光谱)、EA (元素分析) 进行测定, 该反条件下, 浸入浓度为 1% 的 KMnO_4 和 1.0 mol/L 的 KOH 的混合溶液 500mL 反应后, 最终元素分析结果表明 (见表 1), PVP 摩尔数与基膜自身以乙烯基为单元的摩尔数之比为 1: 16。

实施例 2

将直径为 20cm 的 PVDF 平板膜一张, 浸入浓度为 0.2% 的 KMnO_4 和 0.3 mol/L 的 KOH 的混合溶液 500mL, 在 40℃ 温度下反应 6min, 取出膜用蒸馏水漂洗, 洗去表面残留反应液, 浸入 1.0% 浓度的酸性 NaHSO_3 溶液中漂洗直到膜表面恢复成白色, 再将膜浸入 0.5% 的聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 溶液, 在 30℃ 下浸泡 30 min, 然后将膜取出在真空烘箱中干燥 20min, 干燥温度为 40℃, 干燥结束后取样进行分析, 主要通过 FTIR (红外光谱)、EA (元素分析) 进行测定, 该反条件下, 浸入浓度为 0.2% 的 KMnO_4 和 0.3 mol/L 的 KOH 的混合溶液 500mL 反应后, 最终元素分析结果表明 (见表 1), PVP 摩尔数与基膜自身以乙烯基为单元的摩尔数之比为 1: 400。

实施例 3

将直径为 20cm 的 PVDF 平板膜一张, 浸入浓度为 5% 的 KMnO_4 和 5 mol/L 的 KOH 的混合溶液 500mL, 在 70℃ 温度下反应 12min, 取出膜用蒸馏水漂洗, 洗去表面残留反应液, 浸入 3.0% 浓度的酸性 NaHSO_3 溶液中漂洗直到膜表面恢复成白色, 再将膜浸入 3% 的聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 溶液, 在 30℃ 下浸泡 60 min, 然后将膜取出在真空烘箱中干燥 20min, 温度为 60℃, 干燥结束后取样进行分析, 主要通过 FTIR (红外光谱)、EA (元素分析) 进行测定, 该反条件下, 浸入浓度为 5% 的 KMnO_4 和 5 mol/L 的 KOH 的混合溶液 500mL 反应后, 最终元素分析结果表明 (见表 1), PVP 摩尔数与基膜自身以乙烯基为单元的摩尔数之比为 1: 5.8。但是在这种条件下生成的改性膜在超滤装置中很容易损坏。

实施例 4

将直径为 20cm 的 PVDF 平板膜一张, 浸入浓度为 3.0% 的 KMnO_4 和 2.5 mol/L 的

KOH 的混合溶液 500mL, 在 70℃ 温度下反应 8min, 取出膜用蒸馏水漂洗, 洗去表面残留反应液, 浸入 2.5% 浓度的酸性 NaHSO_3 溶液中漂洗直到膜表面恢复成白色, 再将膜浸入 1.0% 的聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 溶液, 在 30℃ 下浸泡 60 min, 然后将膜取出在真空烘箱中干燥 25min, 温度为 50℃, 干燥结束后取样进行分析, 主要通过 FTIR (红外光谱)、EA (元素分析) 进行测定, 该反条件下, 浸入浓度为 3% 的 KMnO_4 和 2.5 mol/L 的 KOH 的混合溶液 500mL 在 70℃ 温度下反应 5min 后, 最终元素分析结果表明, PVP 摩尔数与基膜自身以乙烯基为单元的摩尔数之比为 1: 9。

实施例 5

将直径为 20cm 的 PVDF 平板膜一张, 浸入浓度为 3.0% 的 KMnO_4 和 1.5 mol/L 的 KOH 的混合溶液 500mL, 在 70℃ 温度下反应 8min, 取出膜用蒸馏水漂洗, 洗去表面残留反应液, 浸入 2.5% 浓度的酸性 NaHSO_3 溶液中漂洗直到膜表面恢复成白色, 再将膜浸入 2.0% PVP 溶液中, 在 30℃ 下浸泡 45 min, 然后将膜取出在真空烘箱中干燥 15min, 温度为 50℃, 干燥结束后取样进行分析, 主要通过 FTIR (红外光谱)、EA (元素分析) 进行测定, 该反条件下, 浸入浓度为 3% 的 KMnO_4 1.5 mol/L 的 KOH 的混合溶液 500mL 在 70℃ 温度下反应 8min 后, 最终元素分析结果表明 (见表 1), PVP 摩尔数与基膜自身以乙烯基为单元的摩尔数之比为 1: 11。

实施例 6

将直径为 20cm 的 PVDF 平板膜一张, 浸入浓度为 1.0% 的 KMnO_4 和 2.5 mol/L 的 KOH 的混合溶液 500mL, 在 60℃ 温度下反应 8min, 取出膜用蒸馏水漂洗, 洗去表面残留反应液, 浸入 2.0% 浓度的酸性 NaHSO_3 溶液中漂洗直到膜表面恢复成白色, 再将膜浸入 2.0% PVP 溶液中, 在 30℃ 下浸泡 45 min, 然后将膜取出在真空烘箱中干燥 20min, 温度为 50℃, 干燥结束后取样进行分析, 主要通过 FTIR (红外光谱)、EA (元素分析) 进行测定, 该反条件下, 浸入浓度为 1% 的 KMnO_4 和 2.5 mol/L 的 KOH 的混合溶液 500mL 在 70℃ 温度下反应 12min 后, 最终元素分析结果表明, PVP 摩尔数与基膜自身以乙烯基为单元的摩尔数之比为 1: 10。

实施例 7

将面积为 0.3m^2 的 PVDF 卷式膜一张, 浸入浓度为 3.0% 的 KMnO_4 和 2.5 mol/L 的 KOH 的混合溶液 500mL, 在 60℃ 温度下反应 8min, 取出膜用蒸馏水漂洗, 洗去表面残留反应液, 浸入 2.5% 浓度的酸性 NaHSO_3 溶液中漂洗直到膜表面恢复成白色, 再将膜浸

入 1.0% 的聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 溶液, 在 30℃ 下浸泡 30 min, 然后将膜取出在真空烘箱中干燥 15min, 温度为 60℃, 干燥结束后取样进行分析, 主要通过 FTIR (红外光谱)、EA (元素分析) 进行测定, 该反条件下, 浸入浓度为 3% 的 KMnO_4 和 2.5 mol/L 的 KOH 的混合溶液 500mL 在 70℃ 温度下反应 5min 后, 最终元素分析结果表明 (见表 1), PVP 摩尔数与基膜自身以乙烯基为单元的摩尔数之比为 1: 10.5。

表 1 元素分析结果表格

	C/%	H/%	N/%	PVP/%
实施例 1	41.52	5.18	1.34	1: 16
实施例 2	37.54	3.48	0.04	1: 400
实施例 3	45.65	6.39	3.00	1: 5.8
实施例 4	43.42	5.48	2.03	1: 9
实施例 5	42.64	5.32	1.76	1: 11
实施例 6	42.52	5.06	2.00	1: 10
实施例 7	42.38	5.53	1.88	1: 10.5

关于银杏黄酮提取 (采用实施例 4 所制备的 PVDF-PVP 膜以及实施例 7 所制备的改性卷式膜)

实施例 8

将 10g 银杏叶粗提物浸膏 (黄酮质量含量在 15%) 溶解在 2000mL 30% 的乙醇溶液中, 首先通过膜面积为 0.03m^2 , 孔径为 $0.22\mu\text{m}$ 的聚偏氟乙烯微滤膜 (微滤膜均由上海新亚净化器件厂提供) 在 0.1MPa 压力下微滤, 微滤结束后将透过液通过膜面积为 0.03m^2 , 截留分子量为 70000 道尔顿的 SPES 超滤膜超滤, 温度为 50℃, 压力为 0.2MPa, 超滤结束后将透过液通过膜面积为 0.03m^2 , 截留分子量为 5000 道尔顿的 PVDF-PVP 超滤膜超滤, 操作温度为 20℃, 压力为 0.15MPa, 截留液在 40℃ 下真空浓缩干燥, 即可得到黄酮质量含量在 30% 的 GBE 产品, 得率为 84%。

实施例 9

将 10g 银杏叶粗提物浸膏 (黄酮质量含量在 15%) 溶解在 1000mL 50% 的乙醇溶液

中,首先通过膜面积为 0.03m^2 ,孔径为 $0.22\mu\text{m}$ 的聚偏氟乙烯微滤膜在 0.1MPa 压力下微滤,微滤结束后将透过液通过膜面积为 0.03m^2 ,截留分子量为 70000 道尔顿的 SPES 超滤膜超滤,温度为 45°C ,压力为 0.2MPa ,超滤结束后将透过液利用 NaOH 调节 PH 值为 8.8 后,通过膜面积为 0.03m^2 ,截留分子量为 5000 道尔顿的 PVDF-PVP 超滤膜超滤,操作温度为 40°C ,压力为 0.15MPa ,截留液在 40°C 下真空浓缩干燥,即可得到黄酮质量含量在 34% 的 GBE 产品,得率为 86%。

实施例 10

将 10g 银杏叶粗提物浸膏(黄酮质量含量在 15%)溶解在 500mL 30% 的乙醇溶液中,首先通过膜面积为 0.03m^2 ,孔径为 $0.45\mu\text{m}$ 的聚偏氟乙烯微滤膜在 0.15MPa 压力下微滤,微滤结束后将透过液通过膜面积为 0.03m^2 ,截留分子量为 40000 道尔顿的 SPES 超滤膜超滤,温度为 20°C ,压力为 0.2MPa ,超滤结束后将透过液利用 NaOH 调节 PH 值为 8.8 后,通过膜面积为 0.03m^2 ,截留分子量为 8000 道尔顿的 PVDF-PVP 超滤膜超滤,操作温度为 50°C ,压力为 0.10MPa ,截留液在 50°C 下真空浓缩干燥,即可得到黄酮质量含量在 28.3% 的 GBE 产品,得率为 89%。

实施例 11

将 10g 银杏叶粗提物浸膏(黄酮质量含量在 15%)溶解在 1000mL 20% 的乙醇溶液中,首先通过膜面积为 0.03m^2 ,孔径为 $0.22\mu\text{m}$ 的聚偏氟乙烯微滤膜在 0.1MPa 压力下微滤,微滤结束后将透过液通过膜面积为 0.03m^2 ,截留分子量为 100000 道尔顿的 SPES 超滤膜超滤,温度为 20°C ,压力为 0.3MPa ,超滤结束后将透过液利用 NaOH 调节 PH 值为 8.8 后,通过膜面积为 0.03m^2 ,截留分子量为 8000 道尔顿的 PVDF-PVP 超滤膜超滤,操作温度为 40°C ,压力为 0.25MPa ,截留液在 40°C 下真空浓缩干燥,即可得到黄酮质量含量在 32.2% 的 GBE 产品,得率为 87%。

实施例 12

将 10g 银杏叶粗提物浸膏(黄酮质量含量在 15%)溶解在 1000mL 30% 的乙醇溶液中,首先通过膜面积为 0.03m^2 ,孔径为 $0.22\mu\text{m}$ 的聚偏氟乙烯微滤膜在 0.15MPa 压力下微滤,微滤结束后将透过液通过膜面积为 0.03m^2 ,截留分子量为 70000 道尔顿的 SPES 超滤膜超滤,温度为 45°C ,压力为 0.2MPa ,超滤结束后将透过液利用 NaOH 调节 PH 值为

8.8 后, 通过膜面积为 0.03m^2 , 截留分子量为 5000 道尔顿的 PVDF-PVP 超滤膜超滤, 操作温度为 40°C , 压力为 0.25MPa , 截留液在 40°C 下真空浓缩干燥, 即可得到黄酮质量含量在 36.8% 的 GBE 产品, 得率为 88%。

实施例 13

将 100g 银杏叶粗提物浸膏 (黄酮质量含量在 15%) 溶解在 10000mL 30% 的乙醇溶液中, 首先通过膜面积为 0.1m^2 , 孔径为 $0.45\mu\text{m}$ 的聚偏氟乙烯微滤膜在 0.15MPa 压力下微滤, 温度为 35°C , 微滤结束后将透过液通过膜面积为 0.1m^2 , 截留分子量为 100000 道尔顿的 SPES 超滤膜超滤, 温度为 45°C , 压力为 0.3MPa , 超滤结束后将透过液利用 NaOH 调节 PH 值为 5.5 后, 通过膜面积为 0.3m^2 , 截留分子量为 3000 的 PVDF-PVP 超滤膜超滤, 操作温度为 30°C , 压力为 0.2MPa , 截留液在 40°C 下真空浓缩干燥, 即可得到黄酮质量含量在 26.5% 的 GBE 产品, 得率为 86%。

实施例 14

将 1000g 银杏叶粗提物浸膏 (黄酮质量含量在 15%) 溶解在 100000mL 30% 的乙醇溶液中, 首先通过膜面积为 0.5m^2 , 孔径为 $0.45\mu\text{m}$ 的聚偏氟乙烯微滤膜在 0.3MPa 压力下微滤, 温度为 35°C , 微滤结束后将透过液通过膜面积为 0.5m^2 , 截留分子量为 100000 道尔顿的 SPES 超滤膜超滤, 温度为 35°C , 压力为 0.2MPa , 超滤结束后将透过液利用 NaOH 调节 PH 值为 8.8 后, 通过膜面积为 1m^2 , 截留分子量为 5000 的 PVDF-PVP 超滤膜超滤, 操作温度为 20°C , 压力为 0.3MPa , 截留液在 40°C 下真空浓缩干燥, 即可得到黄酮质量含量在 29.6% 的 GBE 产品, 得率为 82%。

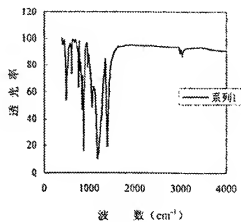


图 1

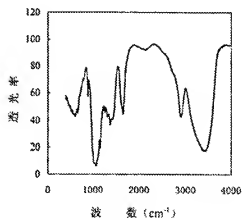


图 2